

＜その2＞ 器具・容器包装におけるビスフェノール A 溶出試験に係わる分析法の検討

研究協力者	片岡 洋平	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	四柳 道代	国立医薬品食品衛生研究所
研究協力者	阿部 裕	国立医薬品食品衛生研究所
研究代表者	六鹿 元雄	国立医薬品食品衛生研究所

A. 研究目的

食品衛生法では、ポリカーボネート(PC)を主成分とする合成樹脂製の器具又は容器包装に対してビスフェノール A (フェノール及び *p-tert*-ブチルフェノールを含む。)の規格が設定されている。その規格値は 3 化合物の溶出量の合算値として 2.5 µg/mL 以下とされており、規格に適合していることを判定するための試験法(以下、告示試験法)も定められている。

告示試験法では、PC 製器具・容器包装を用いる食品の区分によって 4 種類の浸出用液を用いた溶出操作が設定されており、この操作で得られた試験溶液を液体クロマトグラフ(LC)に注入し、試験溶液中の 3 化合物を C18 カラムにより分離後、それらの紫外吸光度を測定して定量する。一方、近年では HPLC の検出器として紫外吸光度等と比べ高い感度と高い選択性が得られる質量分析計(MS)やタンデム型質量分析計(MS/MS)の利用が普及している。

そこで本研究では、前章で実施した本告示試験法の性能評価を目的とした共同試験において、浸出用液がヘプタンの場合の問題点が明らかになったことから、新たにビスフェノール A 分析法を検討した。

また、共同試験の参加機関からの情報提供をもとに、蛍光検出器による分析法(HPLC-FL 法)の適用性についても検討した。

さらに、告示試験法に LC-MS 及び LC-

MS/MS を導入するための共同試験による基礎的検討を実施し、LC-MS 法又は LC-MS/MS 法の適用性を検証した。

B. 研究方法

1. 試薬、試液等

1) ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

水：オルガノ社製超純水装置ピューリック

ω で精製した超純水

アセトニトリル：LC-MS 用、関東化学社製
ヘプタン：環境分析用、富士フィルム和光純薬社製

ビスフェノール A 標準品：環境分析用、関東化学社製

フェノール標準品：特級、関東化学社製

p-tert-ブチルフェノール標準品：環境分析用、関東化学社製

ジエチレングリコール：>99.5%、東京化成工業社製

アセトン：残留農薬・PCB 分析用、シグマアルドリッチ社製

50%アセトニトリル：アセトニトリル 500 mL に水を加えて混和し、正確に 1000 mL とした。

2%ジエチレングリコールーアセトン溶液：ジエチレングリコール 2 mL にアセトンを加えて混和し、正確に 100 mL とした。

1000 µg/mL ビスフェノール A 標準原液：ビスフェノール A 標準品 100 mg をとり、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL

とした。

1000 µg/mL フェノール標準原液：フェノール標準品 100 mg をとり、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

1000 µg/mL *p*-tert-ブチルフェノール標準原液：*p*-tert-ブチルフェノール標準品 100 mg をとり、アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

10 µg/mL 混合標準溶液：ビスフェノール A 標準原液、フェノール標準原液及び *p*-tert-ブチルフェノール標準原液各 1 mL を正確にとり、50%アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

2) HPLC-FL 法の検討

以下に示すもの以外は、①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討と同じものを用いた。

エタノール：環境分析用、富士フィルム和光製薬社製

酢酸：特級、富士フィルム和光製薬社製

4%酢酸：酢酸 40 mL を量り、水を加えて 1000 mL とした。

20%エタノール：エタノール 200 mL を量り、水を加えて 1000 mL とした。

10 µg/mL 混合標準溶液 A：ビスフェノール A 標準原液、フェノール標準原液及び *p*-tert-ブチルフェノール標準原液を各 1 mL を正確にとり、水を加えて正確に 100 mL とした。

10 µg/mL 混合標準溶液 B：ビスフェノール A 標準原液、フェノール標準原液及び *p*-tert-ブチルフェノール標準原液を各 1 mL を正確にとり、4%酢酸を加えて正確に 100 mL とした。

10 µg/mL 混合標準溶液 C：ビスフェノール A 標準原液、フェノール標準原液及び *p*-tert-ブチルフェノール標準原液を各 1 mL を正確にとり、20%エタノールを加えて正確に 100 mL とした。

10 µg/mL 混合標準溶液 D：ビスフェノール A 標準原液、フェノール標準原液及び *p*-tert-ブチルフェノール標準原液を各 1 mL を正確にとり、50%アセトニトリルを加えて正確に 100 mL とした。

2. 検体及び試料

1) ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

前章「器具・容器包装におけるビスフェノール A 溶出試験に係わる試験法の性能評価」の検体 1~8 をのうち、検体 1~6 はそのまま試料 1~6 とし、検体 7 及び 8 は、ヘプタンで 20 倍希釈したものを試料 7 及び 8 とした。

2) HPLC-FL 法の検討

1) ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討 に同じ。

3) LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

前章「器具・容器包装におけるビスフェノール A 溶出試験に係わる試験法の性能評価」の検体 1~2 及び 5~8 に同じ。

3. 分析方法

1) 測定溶液及び試験溶液の調製

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

試料 25 mL を分液漏斗にとり、アセトニトリル 10 mL を加え、5 分間激しく振り混ぜた後、アセトニトリル層を 100 mL のナスフラスコに移した。ヘプタン層にアセトニトリル 10 mL を加え、上記と同様に操作して、アセトニトリル層を上記のナスフラスコに合わせた。次いでナスフラスコにキーパーとして 2%ジエチレングリコールアセトン溶液 0.5 mL を添加し、40°Cの水

浴で加温しつつ、エバポレーターにより溶媒を留去した。これを 50%アセトニトリルで 25 mL に定容して測定溶液とした。

②HPLC-FL 法の検討

試料 1～試料 6 はそのまま測定溶液とした。試料 7 及び試料 8 は ①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討 に示す方法で調製した溶液を測定溶液とした。

③LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

浸出用液として水、20%エタノールを用いた場合は、検体を水で 25～200 倍希釈した溶液を試験溶液とした。浸出用液としてヘプタンを用いた場合は、まず検体をヘプタンで 20 倍希釈した溶液 25 mL を分液漏斗に移し、アセトニトリル 10 mL を加え、5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を 25 mL 容のメスフラスコに移した。ヘプタン層にアセトニトリル 10 mL を加え、上記と同様に操作して、アセトニトリル層を上記のメスフラスコに合わせた。次いでアセトニトリルを加えて 25 mL とし、これを水で 25～200 倍希釈した溶液を試験溶液とした。

2) 検量線用測定溶液及び検量線用標準溶液の調製

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

10 µg/mL 混合標準溶液を 1、2、3、4 及び 5 mL を正確にとり、それぞれ 50%アセトニトリルを用いて正確に 20 mL とした (0.5、1、1.5、2 及び 2.5 µg/mL)。また、0 µg/mL として 50%アセトニトリルを用いた。

②HPLC-FL 法の検討

試料の浸出用液の種類 (ただし、試料 7 及び試料 8 は 50%アセトニトリル) に対応する 10 µg/mL 混合標準溶液 (A～D) を 1、

2、3、4 及び 5 mL を正確にとり、それぞれの浸出用液を用いて正確に 20 mL とした (0.5、1、1.5、2 及び 2.5 µg/mL)。また、0 µg/mL としてそれぞれの浸出用液 (ただし、ヘプタンを浸出用液とする試料では 50%アセトニトリル) を用いた。

③LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

ビスフェノール A をそれぞれ 0.005、0.075、0.01、0.025 及び 0.05 µg/mL 含む検量線用標準溶液を水で調製した。

3) 装置等

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

HPLC 及び紫外吸光度検出器 : Agilent 1100 シリーズ、Agilent Technologies 社製

②HPLC-FL 法の検討

HPLC : Prominence LC システム、島津製作所社製

蛍光検出器 : RF-10AXL、島津製作所社製

③LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

共同試験に参加する機関が所有する、以下の機器を用いた。

HPLC :

①Acquity UPLC システム、日本ウォータース社製

②NexeraXR システム、島津製作所社製

③Exion AC システム、AB SCIEX 社製

④Agilent シリーズ、Agilent Technologies 社製

MS 及び MS/MS :

①TQD 又は Xevo TQ 又は TQ-XS、日本ウォータース社製

②LCMS-2010 又は LCMS-2020、島津製作所社製

③API 4000 又は Triple Quad 4500、AB SCIEX 社製

④ Agilent 6460 Triple Quad、Agilent

Technologies 社製

4) 分析条件

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

- ・カラム: TSKgel ODS-80Ts、内径: 4.6 mm、長さ: 250 mm、粒子径: 5 μm 、Tosoh Bioscience 社製
- ・流速: 1 mL/min
- ・カラム温度: 40°C
- ・注入量: 100 μL
- ・移動相 A: アセトニトリル、移動相 B: 水 A/B: 30:70-100:0 (0-35 min)- 100:0 (35-45 min)- 30:70 (45-55 min)
- ・測定波長: 217 nm

②HPLC-FL 法の検討

以下に示すもの以外は、①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討と同じ。

- ・励起波長: 230 nm
- ・蛍光波長: 316 nm

③LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

HPLC 条件

以下に示すもの以外は、①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討と同じ。

・カラムは共同試験に参加する機関が所有する、以下のカラムを用いた。

- ①Inertsil ODS4、内径 2.1 mm、長さ 100 mm、粒子径 3 μm 、GL サイエンス社製
- ②Inertsil ODS4、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 、GL サイエンス社製
- ③Inertsil ODS4、内径 3.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 、GL サイエンス社製
- ④Shim-pack XR-ODS、内径 3.0 mm、長

さ 100 mm、粒子径 3 μm 、島津製作所社製

- ⑤L-Column2 ODS、内径 2.1 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 、化学物質評価研究機構社製

- ⑥Cadenza CD-C18、内径 2.0 mm、長さ 150 mm、粒子径 3 μm 、Imtakt 社製

- ・注入量: 20 μL
- ・流速: 0.2 mL/min 又は 0.124 mL/min

MS 条件

以下に示す条件以外は各測定機器により最適化した。

- ・イオン化法: ESI (-)
- ・測定イオン m/z 227

MS/MS 条件

以下に示す以外は MS 条件と同じ。

- ・プリカーサーイオン m/z 227
- ・プロダクトイオン m/z 212、133

5) 定量

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

検量線用測定溶液を HPLC に注入し、各分析対象化合物の信号強度（ピーク面積又は高さ）と濃度との 1 次回帰式を求め、各分析対象化合物の検量線を作成した。各試料 10 点から調製した測定溶液をランダムで測定し、作成した各検量線に測定溶液の各分析対象化合物の信号強度を内挿して分析値を算出した。

②HPLC-FL 法の検討

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討と同じ。

③LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討と同じ。ただし、測定では各検体の試験溶液 2 点を併行分析した。

6) 分析結果の解析

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

解析は Microsoft Excel 2019 を使用し、得られた分析値から併行精度 (RSD%) と真度を推定した。なお、試料濃度に対する各分析対象化合物の併行分析の分析値の平均値との比を真度として求めた。

②HPLC-FL 法の検討

①ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討と同じ。

③LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

解析は Microsoft Excel 2019 を使用し、報告された分析結果について外れ値検定を行わずに一元配置の分散分析により、併行相対標準偏差 (RSD_r %) と室間再現相対標準偏差 (RSD_R %) を推定し、分析法の計画書で設定した分析法の性能パラメータの目標値との比較を行った。設定した目標値は以下の通りである。

RSD_r : 10%以下

RSD_R : 25%以下

真度: 80%~110%

なお、真度は、各機関の分析値の平均値と検体濃度の比の百分率として算出した。

4. LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

1) 参加機関

共同試験の計画及びプロトコール作成には、民間の登録検査機関の 10 機関と公的な衛生研究所などの 11 機関が参加した。このうち登録検査機関の 2 機関はそれぞれ異なる 2 つの機関で試験を実施したため、今回はこれらをすべて別機関として扱い、23 機関が参加した。このうち LC-MS 法の共同試験の実施に 8 機関、LC-MS/MS 法の共同試験の実施に 9 機関が参加した。

2) 検体の均質性及び安定性の確認

前章「器具・容器包装におけるビスフェノール A 溶出試験に係わる試験法の性能評価」に同じ。

3) 共同試験の実施と解析

共同試験は「<別添 1>令和元年度 共同試験 計画書 (以下、計画書)」にしたがい実施した。計画書には、分析方法の他、分析の全般、送付検体の保管、分析計画、分析実施期間、分析結果の報告に関する注意事項を示した。

分析結果の報告では、Microsoft Excel を使って作成した報告様式を配布し、分析結果の他、分析環境の情報、また分析に関して気づいた点などの情報を提供するように参加機関に依頼した。共同試験の分析の実施期間は、検体到着後の 2019 年 9 月 18 日~2019 年 11 月 22 日の約 2 ヶ月間とした。

C. 研究結果及び考察

1. ヘプタンを浸出用液とする溶出試験のビスフェノール A 分析法の検討

1) 測定溶液のアセトニトリルの割合の検討

告示試験法の測定溶液の調製法は、まず、溶出試験後の溶液 25 mL を分液漏斗に移し、アセトニトリル 10 mL を加え、5 分間激しく振り混ぜた後、静置し、アセトニトリル層を 25 mL 容のメスフラスコに移す。次に、ヘプタン層にアセトニトリル 10 mL を加え、上記と同様に操作して、アセトニトリル層を上記のメスフラスコに合わせ、アセトニトリルを加えて 25 mL に定容することになっている。このように、告示試験法の測定溶液はアセトニトリルであるため、各分析対象化合物のピーク形状が対称とならずに崩れる現象が見られることがあった。そこで、測定溶液のアセトニト

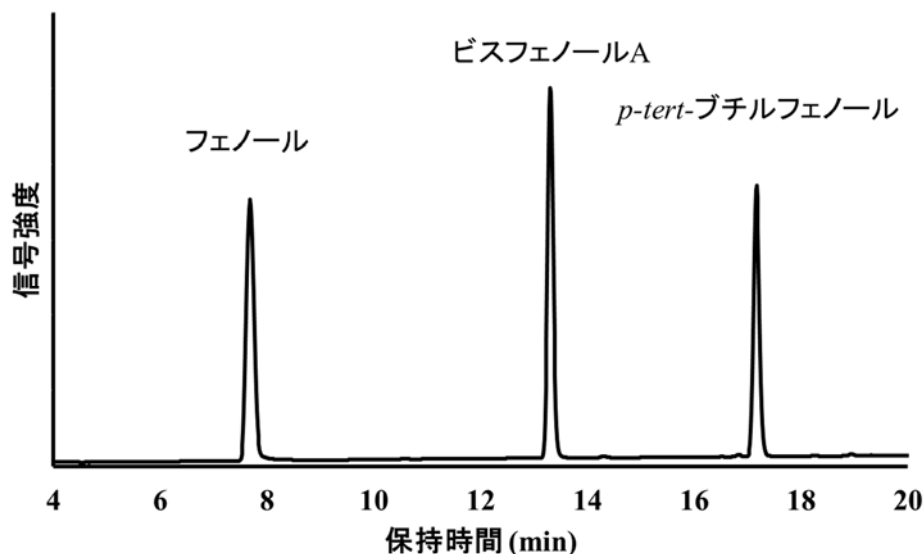


図1 測定溶液の組成が50%アセトニトリルの場合のHPLCのクロマトグラム例

リルと水の割合とピーク形状の関係を標準溶液で検討したところ、アセトニトリルの割合を低下させることで、ピーク形状の対称性が改善した。測定溶液のアセトニトリルの割合を100%から50%にすることで、ピーク形状が対称かつシャープになった(図1)。

2) 測定溶液の調製法の検討

測定溶液のアセトニトリルの割合を50%にするため、ヘプタンから転溶後のアセトニトリルを留去し、改めて50%アセトニトリルで定容することを検討した。標準溶液を用いてアセトニトリルを留去操作する5併行分析を行い、標準溶液の濃度に対する5併行分析の分析値の平均値の百分率を真度として求めた。キーパーを入れずにアセトニトリルを留去したところ、真度はフェノール及び*p-tert*-ブチルフェノールでそれぞれ90%未満となり、これらの蒸発が疑われた。そのため、残留農薬の分析法などでエバポレーターでの溶媒留去の際にキーパーとして使用されるジエチレングリコールの使用を検討し、2%ジエチレングリコール-アセトン溶液を0.5 mL添加

した¹⁾。また、参考にした分析法にならない、エバポレーターの水浴の温度は最大でも40°Cとした。ただし、アセトニトリルを留去後の窒素パージによる乾固の操作はフェノールの揮発性を考慮して、行わないことにした。これらの分析条件で検討した結果、すべての分析対象化合物で真度が改善し、ほぼ100%となった(図2)。

以上の結果から、測定溶液の調製は、ヘプタンの溶出液をアセトニトリルに転溶後、2%ジエチレングリコール-アセトン溶液0.5 mLを添加し、エバポレーターでアセトニトリルを留去後、50%アセトニトリルで25 mLに定容することとした。

3) 検量線用測定溶液の検討

告示試験法の検量線用測定溶液は水で調製することになっており、測定溶液とはアセトニトリルの含有量に違いがある。このため、測定の際の吸光度に違いが生じ、分析機器の性能によっては分析値に影響を及ぼすと考えられた(図3)。そこで、検量線用測定溶液のアセトニトリルの割合についても50%とし、調製では50%アセトニトリルを用いることにした。

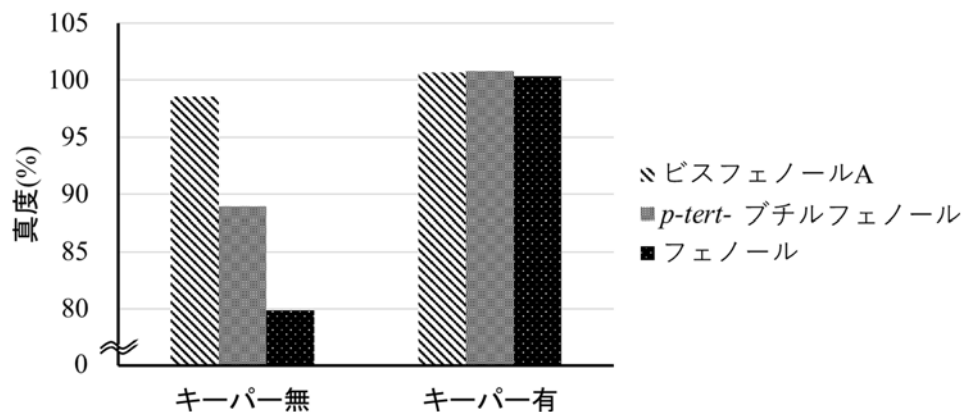


図 2 キーパー添加の有無による分析の真度の推定結果

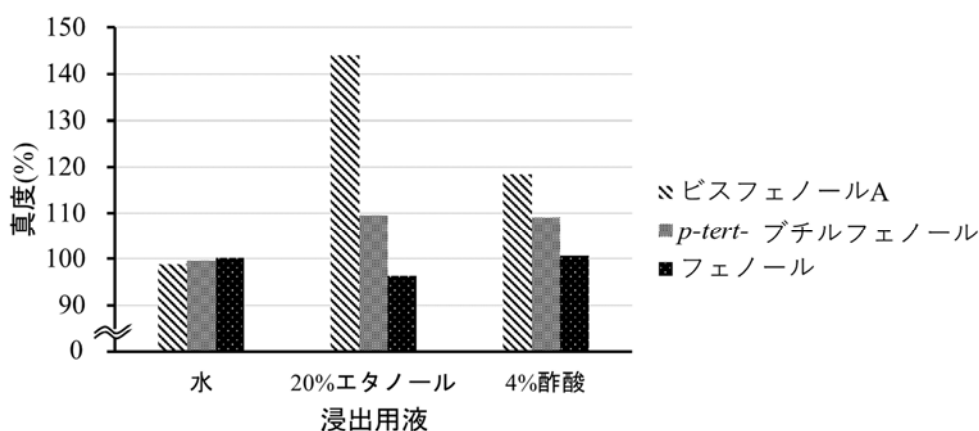


図 3 告示試験法を用いた試料分析の真度の推定結果

4) HPLC への注入量の検討

前章の共同試験の結果とともに機関 E より、測定溶液の注入量を減らすことで、各分析対象化合物のピーク形状が改善される旨の情報が提供された。そこで、告示試験法の注入量 100 μL からの変更を検討した。その結果、測定溶液の組成がアセトニトリルであっても、注入量が 20 μL 程度まで減らすことでピーク形状が改善することを確認した (図 4)。

しかし、分析機器の感度等を考慮して、注入量は 100 μL のままとした。

5) 構築したビスフェノール A 分析法の性能評価

試料 7 及び 8 をそれぞれ 10 併行分析した結果を表 1 に示した。併行精度 (RSD %) は 0.9~1.3%、真度 98~100%であった。

以上の結果より、構築した分析法はビスフェノール A、フェノール及び p-tert-ブチルフェノールを公定法よりも優れた性能で定量可能であることが示唆された。

表 1 構築したビスフェノール A 分析法の性能評価結果

試料	試料濃度 (μg/mL)	分析対象化合物	濃度 (μg/mL)					平均値 (μg/mL)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)
試料7	2.4	ビスフェノールA	2.36	2.39	2.35	2.41	2.38	2.38	1.0	99
			2.39	2.41	2.36	2.34	2.40			
		フェノール	2.43	2.43	2.36	2.42	2.40	2.41	1.0	100
			2.41	2.42	2.40	2.45	2.39			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	2.42	2.46	2.40	2.39	2.37	2.39	1.2	100
			2.38	2.38	2.39	2.38	2.37			
試料8	0.8	ビスフェノールA	0.789	0.787	0.802	0.786	0.790	0.788	0.9	99
			0.787	0.794	0.782	0.790	0.776			
		フェノール	0.798	0.785	0.787	0.764	0.791	0.783	1.3	98
			0.787	0.785	0.788	0.771	0.776			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	0.796	0.793	0.797	0.785	0.797	0.789	0.9	99
			0.788	0.785	0.793	0.787	0.773			

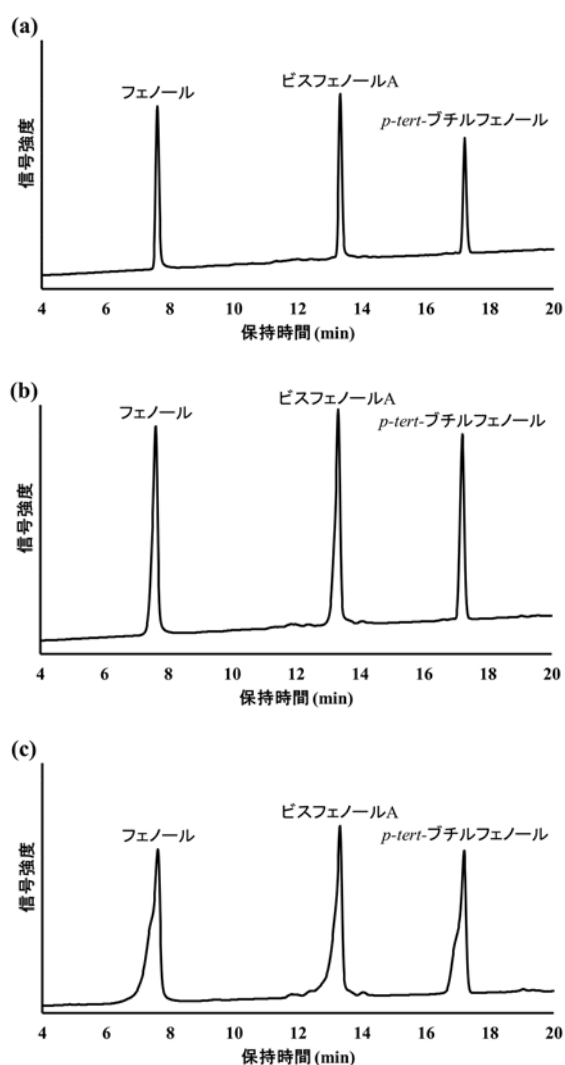


図 4 ヘプタンを浸出用液とする溶出試験の注入量の違いによる HPLC のクロマトグラムの例
 注入量:(a) 10 μL (b) 20 μL (c) 50 μL

2. HPLC-FL 法の検討

前章の共同試験の結果とともに機関 S より、ビスフェノール A、フェノール及び *p-tert*-ブチルフェノールを蛍光検出器により分析可能である旨の情報が提供された。そこで、機関 S から提供された蛍光検出器の励起波長と蛍光波長を用いて検討した。

各浸出用液における検量線用測定溶液及び測定溶液を蛍光検出器により分析した結果、各分析対象化合物のクロマトグラムにおけるピーク形状は対称かつシャープであり、またピークの近傍に定量を著しく妨害するようなピークは見られなかった(図 5)。このため、蛍光検出器による分析でも各分析対象化合物の定量は可能であることを確認した。

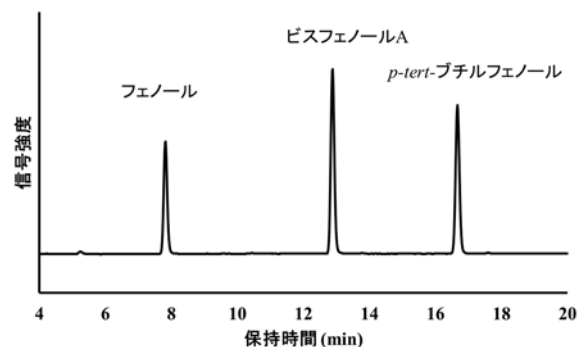


図 5 HPLC-FL 法のクロマトグラム例

蛍光検出器を用いた試料 1～試料 8 の各 10 点の分析結果を表 2 に示した。各試料をとおして、併行精度は 0.1～2.9%、真度は 94～102%であった。

以上の結果より、HPLC-FL 法はビスフェ

ノール A、フェノール及び *p-tert*-ブチルフェノールを分析時に大きな支障をきたすことなく定量可能な分析法であり、公定法の代替法としての活用が期待できると考えられた。

表 2 HPLC-FL 法の性能評価結果

試料	試料濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	分析対象化合物	濃度 ($\mu\text{g/mL}$)					平均値 ($\mu\text{g/mL}$)	併行精度 (RSD%)	真度 (%)
試料1	2.3	ビスフェノールA	2.27	2.28	2.29	2.29	2.29	2.28	0.4	99
			2.27	2.28	2.28	2.27	2.29			
		フェノール	2.31	2.31	2.32	2.29	2.33	2.31	0.6	100
			2.29	2.30	2.30	2.32	2.29			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	2.28	2.28	2.28	2.31	2.26	2.28	0.8	99
			2.29	2.25	2.30	2.28	2.30			
試料2	0.9	ビスフェノールA	0.845	0.862	0.852	0.880	0.857	0.860	1.7	96
			0.881	0.840	0.855	0.850	0.877			
		フェノール	0.932	0.906	0.919	0.920	0.908	0.913	2.0	101
			0.917	0.937	0.878	0.923	0.889			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	0.903	0.918	0.902	0.885	0.853	0.893	1.9	99
			0.892	0.887	0.895	0.892	0.899			
試料3	2.4	ビスフェノールA	2.44	2.43	2.43	2.44	2.43	2.44	0.2	102
			2.45	2.43	2.44	2.44	2.44			
		フェノール	2.37	2.41	2.39	2.36	2.40	2.39	0.7	99
			2.40	2.39	2.40	2.37	2.37			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	2.40	2.39	2.40	2.41	2.39	2.40	0.3	100
			2.40	2.39	2.39	2.40	2.40			
試料4	0.9	ビスフェノールA	0.924	0.925	0.920	0.921	0.922	0.918	0.6	102
			0.915	0.911	0.917	0.910	0.914			
		フェノール	0.876	0.881	0.871	0.877	0.880	0.880	0.8	98
			0.878	0.885	0.893	0.873	0.888			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	0.911	0.909	0.904	0.904	0.903	0.906	0.4	101
			0.911	0.905	0.902	0.902	0.907			
試料5	2.3	ビスフェノールA	2.28	2.31	2.32	2.34	2.31	2.31	0.6	101
			2.32	2.32	2.32	2.31	2.31			
		フェノール	2.28	2.28	2.27	2.28	2.26	2.27	0.3	99
			2.26	2.27	2.26	2.26	2.26			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	2.30	2.30	2.30	2.30	2.31	2.30	0.1	100
			2.30	2.30	2.31	2.30	2.30			
試料6	0.8	ビスフェノールA	0.794	0.794	0.797	0.805	0.793	0.797	0.5	100
			0.793	0.797	0.796	0.804	0.795			
		フェノール	0.802	0.800	0.797	0.800	0.806	0.802	0.5	100
			0.801	0.810	0.805	0.802	0.802			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	0.799	0.798	0.802	0.807	0.800	0.803	0.5	100
			0.809	0.808	0.802	0.801	0.805			
試料7	2.4	ビスフェノールA	2.43	2.44	2.43	2.44	2.45	2.44	0.6	102
			2.45	2.43	2.44	2.41	2.46			
		フェノール	2.37	2.38	2.36	2.37	2.43	2.37	0.9	99
			2.38	2.36	2.37	2.35	2.36			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	2.38	2.38	2.36	2.39	2.40	2.39	0.6	99
			2.40	2.39	2.40	2.37	2.37			
試料8	0.8	ビスフェノールA	0.781	0.790	0.789	0.763	0.714	0.772	2.9	97
			0.779	0.781	0.784	0.767	0.776			
		フェノール	0.754	0.730	0.740	0.733	0.744	0.754	2.2	94
			0.760	0.761	0.764	0.775	0.778			
		<i>p-tert</i> -ブチルフェノール	0.751	0.746	0.759	0.753	0.754	0.757	0.8	95
			0.758	0.759	0.763	0.765	0.761			

3. LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の共同試験

1) 検体の均質性及び安定性

前章「器具・容器包装におけるビスフェノール A 溶出試験に係わる試験法の性能評価」の結果に同じ。

2) 分析結果の解析と目標値との比較

共同試験の分析は 10 月 1 日から 11 月 20 日までに実施され、計画書の実施期間内に完了した。

LC-MS 法による 7 機関の分析及び解析結果を表 3、LC-MS/MS 法による 9 機関の結果を表 4 に示した。なお、LC-MS 法による参加の 8 機関のうち機関 I については全ての検体をとおして添加濃度と分析値の乖離が大きかったため、分析が適当な条件で実施できなかった可能性が考えられたことから、結果の解析からは除いた。

RSD_r は浸出用液がヘプタンである検体 8 の LC-MS 分析で目標値 (10%以下) を満たさなかったが、LC-MS/MS 法での分析を含め、その他の分析では目標値を満たした。

RSD_R は、浸出用液が 20%エタノールである検体 6 と浸出用液がヘプタンである検体 7 の LC-MS 分析、ならびに浸出用液がヘプタンである検体 7 と検体 8 の LC-MS/MS 分析で目標値 (25%以下) を満たさなかったが、その他の分析では目標値を満たした。

真度は、浸出用液が水である検体 1 の LC-MS/MS 分析のみ全ての機関で目標値 (80%~110%) を満たしたが、それ以外の分析では目標値を満たさない機関が多数あった。特に、浸出用液がヘプタンである検体 7 と検体 8 の分析では、約半数以上の機関で目標値を満たさなかった。

以上の結果と前章の結果と比較すると、LC-MS 法及び LC-MS/MS 法の性能は告示

試験法よりも低いことが考えられ、現状では規格を判定する分析法として妥当な水準にないことが示唆された。

D. 結論

告示試験法の浸出用液がヘプタンである場合の分析法を新たに構築した。その結果、規格の適否判定を行うための分析法として、妥当な水準にある可能性が期待された。

さらに、告示試験法での紫外吸光度検出器に代わる検出器として蛍光検出器の適用を検討した結果、4 種すべての浸出用液の場合で、蛍光検出器による分析と定量が可能であることが確認され、告示試験法の代替法として活用可能であることが示唆された。今後は、これら 2 つの分析法について室間共同試験による性能評価より、分析法としての妥当性を確認する予定である。

また、告示試験法のビスフェノール A 溶出試験法への LC-MS 法または LC-MS/MS 法の適用性を検証するため、23 機関が参加する共同試験による基礎的検討を実施した。このうち共同試験には、LC-MS 法に 8 機関、LC-MS/MS 法に 9 機関が参加し、共同試験により得られた分析結果を、統計的に解析した。結果として、共同試験の計画書で設定した RSD_r 、 RSD_R を満たすことができない場合や真度を満たさない機関が多数あったことから、現状では告示試験法への適用は難しいことが示唆され、さらなる検討が必要であることが明らかとなった。

E. 参考文献

- 1) 厚生労働省 食品に残留する農薬等の試験法 「シフルメトフェン試験法(農産物)」

表 3 LC-MS 法の性能パラメーターの解析結果と目標値との比較

機関	ビスフェノールA濃度(μg/mL)											
	検体1		検体2		検体5		検体6		検体7		検体8	
	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2
D	1.79	1.86	0.765	0.723	2.07	1.93	0.673	0.703	1.92	1.87	0.700	0.743
E	2.01	2.10	0.843	0.852	2.08	2.14	0.821	0.798	1.91	1.87	0.723	0.720
F	2.65	2.65	1.130	1.140	2.82	2.99	1.430	1.240	2.69	2.84	0.930	1.320
J	2.58	2.54	0.949	0.951	2.68	2.81	0.894	0.894	0.97	0.98	0.796	0.891
L	2.04	2.04	0.878	0.883	2.14	2.07	0.794	0.729	0.92	1.05	0.920	0.941
T	2.02	1.98	0.677	0.690	1.85	1.92	0.678	0.645	4.28	4.15	0.921	0.928
X	2.21	2.22	0.868	0.862	2.22	2.19	0.777	0.797	2.21	2.19	0.791	0.785
機関数	7		7		7		7		7		7	
平均値 (μg/mL)	2.19		0.872		2.28		0.848		2.13		0.865	
併行相対標準偏差 RSD _r (%)	1.6		1.4		3.3		6.6		3.1		12	
目標値(併行精度)との適合性* ¹	+		+		+		+		+		-	
室間再現相対標準偏差 RSD _R (%)	14		17		17		27		53		19	
目標値(室間精度)との適合性* ²	+		+		+		-		-		+	
外れ値(真度)* ³ になった機関数	3		2		2		2		6		3	
外れ値(真度)率* ⁴ (%)	43		29		29		29		86		43	

*1 目標値(併行精度)との適合性：適合(併行相対標準偏差 RSD_rが10%を超えない)：+、不適合(RSD_rが10%を超える)：-

*2 目標値(室間精度)との適合性：適合(室間再現相対標準偏差 RSD_Rが25%を超えない)：+、不適合(RSD_Rが25%を超える)：-

*3 外れ値(真度)：[(各機関の定量値の平均値) / 検体濃度 × 100 (%)] の値が 80%未満または 110%を超える

*4 外れ値(真度)率：[外れ値(真度)になった機関数 / 機関数(7機関)] × 100 (%)

表 4 LC-MS/MS 法の性能パラメーターの解析結果と目標値との比較

機関	ビスフェノールA濃度(μg/mL)											
	検体1		検体2		検体5		検体6		検体7		検体8	
	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2	併行分析1	併行分析2
C	2.33	2.21	0.882	0.861	2.22	2.21	0.816	0.798	1.92	2.01	0.602	0.664
D	2.28	2.36	0.888	0.850	2.17	2.25	0.770	0.778	1.97	1.97	0.663	0.755
E	2.03	1.96	0.711	0.726	2.14	2.33	0.841	0.869	2.29	2.11	0.814	0.786
J	1.82	1.88	0.534	0.543	2.02	1.84	0.467	0.423	0.46	0.48	0.337	0.455
K	2.28	2.26	0.893	0.855	2.47	2.38	0.872	0.880	3.61	3.44	1.050	1.050
L	1.98	1.95	1.160	1.190	3.03	3.16	1.000	0.812	1.77	1.76	1.340	1.430
P	2.20	2.21	0.876	0.894	2.31	2.30	0.861	0.856	2.80	2.90	1.270	1.330
T	1.90	1.95	0.666	0.651	1.88	1.87	0.636	0.657	4.51	4.47	1.680	1.690
W	2.14	1.95	0.688	0.690	2.41	2.56	0.577	0.642	2.64	2.96	0.840	0.845
機関数	9		9		9		9		9		9	
平均値 (μg/mL)	2.09		0.809		2.31		0.753		2.45		0.978	
併行相対標準偏差 RSD _r (%)	3.0		2.1		3.6		6.5		4.1		4.7	
目標値(併行精度)との適合性*1	+		+		+		+		+		+	
室間再現相対標準偏差 RSD _R (%)	8.6		23		16		21		47		42	
目標値(室間精度)との適合性*2	+		+		+		+		-		-	
外れ値(真度)*3になった機関数	0		5		1		3		6		6	
外れ値(真度)率*4 (%)	0		56		11		33		67		67	

*1 目標値(併行精度)との適合性：適合(併行相対標準偏差 RSD_rが10%を超えない)：+、不適合(RSD_rが10%を超える)：-

*2 目標値(室間精度)との適合性：適合(室間再現相対標準偏差 RSD_Rが25%を超えない)：+、不適合(RSD_Rが25%を超える)：-

*3 外れ値(真度)：[(各機関の定量値の平均値) / 検体濃度 × 100 (%)] の値が 80%未満または 110%を超える

*4 外れ値(真度)率：[外れ値(真度)になった機関数 / 機関数(9機関)] × 100 (%)